

Munkacsoportunk egyik kutatási témája a csirke matrilin-1 gén (*Matn1*) expressziós szabályozásának vizsgálata. A matrilinok családja egyike az extracelluláris mátrix kialakításában résztvevő fehérje családoknak és négy képviselője van (*Matn1*, *Matn2*, *Matn3* és *Matn4*), melyek közül a legjobban jellemzett, a *Matn1*, a porcos vázelemekben fejeződik ki. A matrilin-1 gén egyedi sajátossága, hogy expressziója csak bizonyos fejlődési stádiumú porcsejtekre és a növekedési korong meghatározott (proliferatív és prehipertróf) zónáira korlátozódik. E sajátos kifejeződés miatt a matrilin-1 gént fejlődés- és szövetspecifikus marker génnek tekinthetjük. A gén szabályozó régiója igen komplex magába foglal egy 2011 bp-os promoter régiót és egy 1819 bp-os introni szakaszt is. Ezek a DNS régiók a kötőhelyei a csontnövekedés szabályozásában fontos szerepet játszó morfogéneknek és növekedési faktoroknak. A porc-specifikus génexpresszió szabályozásban kiemelkedő szerep jut a HMG-box DNS-kötő doménnel rendelkező Sox transzkripció faktor család több tagjának (Sox9, Sox5, Sox6). A Sox9 felelős a mesenchyma sejtek kondenzációjáért és a porcdifferenciálódás elindításáért és a porcépződés fő transzkripció faktorának tekinthető, jelenléte elengedhetetlen a SOX5 és SOX6 gének bekapcsolásához. A matrilin-1 génexpressziójához mindhárom Sox fehérje szükséges.

Korábbi transzgenikus egér kísérletekben a csoport kimutatta, hogy a specifikus transzgén kifejeződéshez elegendő akár a távoli promoter régiók, akár az introni régiók rövid promoterhez történő kapcsolása. Magas szintű expresszióhoz viszont mindhárom régió együttes jelenléte szükséges. A génexpressziót szabályozó DNS elemek pontosabb behatárolása során elvégzett számítógépes szekvenciaanalízis alapján több, az amniótáknál erősen konzervált, DNS szakaszt azonosítottak a TATA motívum közelében (Pe1, Ine) valamint a távoli promoter régióban (Dpe1, Dpe2).

Feladataim közé tartozott:

1. a távoli szabályozó régiók feltérképezése és a rövid promoter elemeivel kialakított kölcsönhatásának tanulmányozása, a kérdéses DNS-elemek beépítése a rövid matrilin-1 promoter által meghajtott Luciferáz gén elé, ezáltal tranziens expressziós kísérletek végrehajtására alkalmas vektorok létrehozása a DNS-elem funkcionális és mutációs analiziséhez, valamint kotranszfekciós kísérletekhez,
2. a funkcionális kísérletekben működő DNS elem DNS-fehérje kölcsönhatásainak vizsgálata *in vitro*: EMSA, supershift, sejtkivonatok és GST-fúziós, tisztított fehérjék segítségével,

a jellemzett DNS-elemekhez kötődő új transzkripció faktorok azonosítása szilárd hordozóhoz rögzített kétszálú oligonukleotidok és MALDI-tömegspektroszkópia, illetve kromatin immunprecipitáció segítségével.

1. A tranziens expressziós és kotranszfekciós kísérletekben két vektort használtam viszonyításként: a rövid matrilin-1 promoter (a -334 ÷ +67 promoter régió) által meghajtott luciferáz riporter-gént tartalmazó vektort (FO15Luc), illetve teljes hosszúságú, 5' végi matrilin-1 promoter (a -2011 ÷ +67 promoter régió) által meghajtott luciferáz riporter-gént tartalmazó vektort (AC8Luc). A konstrukciók szövetspecifikus aktivitását nagy denzitású mesenchyma sejt kultúrában (HDM), csirke chondrocita kultúrákban (CEC) és csirke fibroblasztokban (CEF) vizsgáltam. Az AC8Luc magas szövetspecifikus aktivitással bír: 18x nagyobb riporter aktivitást mutat chondrocitákban, HDM kultúrában csak 1,5x aktívabb, míg fibroblaszt kultúrában közel azonos aktivitású, mint az FO15Luc.

A távoli szabályozó régió feltérképezését olyan konstrukciók létrehozásával kezdtem, melyekben

a 2011 bp-os promoter egyre rövidebb szakaszait az FO15Luc vektor rövid matrilin-1 promotere elé építettem. A 15FO-PSLuc x9kban áchondrocyt (948-€ 2011-) , a 15FO-PBLuc € 2011-) x6 (1134, a 15FO-PELuc 15mind az FO ,st mutatottáx nagyobb aktivit7,5 (1394 € 2011-)Luc,a 15FO-PHLuc s a é A HDM .an alacsony voltóhoz hasonlása a kontrolláaktivit (1741 € 2011-) A magasabb chondrocyta .sérétt alig volt eltözösok kákban a riporter aktivitárúfibroblast kult g éksúra szászakasz (1394 € 2011-)os -bp700bb álegal ógiévoli promoter rát a tárt tehésáaktivit € 1863-) 1lt Dpeátt konzervözöta fajok kójelen az amni Ebben a fragmentumban vannak .van k éréjéfeh 6Sox ,5Sox ötök-melyeken a DNS ,elemek is-DNS (1644- € 1717-) 2s Dpeé (1807-nak ásaelem hat-t DNSéA k .lniáinak nyomait lehet megtalászekvenci öfelismer özóhord (4€ 1)nyban áldébb pön tölük-nölüemeket ktettem ezen elíszéhoz elkásányozátanulm 15FOLucitam a árletekben vizsgálás kós tranziens expresszié s vektorokatótranszfekci áalap t áasaelemek porcspecifikus hat 2s Dpeé 1Dpeluciferáza ,Azt tapasztaltam hogy .sraáaktivit 4 ,stáz aktivitávelte a porcspecifikus luciferómegn (x14)sen öte jelentés jelenlápiók 3 1Dpe ami ,stán aktivitég-ltal hajtott riporterá promoter 1-vid matrilinövelte a rön (x24)ban pedig ápiók 8g az ACémLuc 15FO-1A Dpe .t is meghaladtaásaaktivitLucban ápiók 1mely ) ókonstrukci ,lánéx volt nagyobb a kontroll1,5ssze ösa mindáporcspecifikus aktivit (elemet 1tartalmazta a Dpe ótartalmaz ,elemet 1benne a Dpe ,tógévoli promoter rávidebb tógott a legráami egybev 15FO-PHLuckban nem ást chondrocytában ilyen hatéelem eset 2A Dpe .valásáhat ólávektor aktiv .sán aktivitég-a riporter ékban emelkedett meg kissárúbb a HDM kultáitt ink ,tapasztaltam ,2 ,1 (1609- € 1902-)os DNS szakaszt -bp 90 ötösszekö illetve az azokat ,t elemetéAmikor a k 15nyban az FOáldép 4illetve Lucnok csirke chondrocyta ós klóapott transzfekcia k ,tettemípé ba- 15mint FO ,x volt nagyobb3ben is alig épia esetók 4g ésa máv aktivitírt relatékban márúcultLuc óelemet tartalmaz 1Dpe 4r ányban a máldép 2vagy ,1elemet 2Ha viszont a Dpe .saáaktivit gy í ) ézőpromoter k 1-vid matrilinös a ré elemek 1em be a Dpetettípe be-ns DNSÁrekombin 15FO-2Dpe-1Dpe4kapva a Luc15FO-2Dpe2-1Dpe4illetve a ,Lucz áa lucifer (katókonstrukci nok ókl óelemeket tartalmaz 1kkent a csak Dpeókal cs-%52tlag á banárús CEC kultáaktivit 15sen meghaladta az FOögy is jelentí gér máb ,(re-x111 ör-x24a ) pestéához kásaaktivitLuc melyek ,tádnék tehötös faktorok kóelemhez olyan transzkripci 1A Dpe .tásaaktivit s é tveísegően előfeltehet ,t porcsejtekbenásávid promoter aktivitövelik a rökben nérténagym s é 1mint a Pe ,vid promoter elemeivelöt a rásánhatölcsövoli promoter elemek kát lva áastabiliz 1kkenti a Dpeócs -kben értém öggül fótádjóm óciáa kombin -elem ezzel szemben 2A Dpe .Ine .tásaáhat óláelem aktiv

A Dpe1 szerepét a porcspecifikus aktivitásban az is alátámasztja, hogy ha a Dpe1 elemet kivágtam (a -1850÷-1739 pozíciók közötti DNS szakasz, ΔDpe1/2-AC8Luc konstrukció) az 5' f végi szabályozó régió chondrocyta specifikus aktivitása a felére csökkent (8,3x volt nagyobb az FO15Luc-énál), míg a CEF kultúrákban mért luciferáz aktivitás változatlan marad. Ha a deletált szakasz a -1926÷-1745 pozíciók közötti régiót érintette (ΔDpe1/1-AC8Luc), a porcspecifikus aktivitás az AC8Luc aktivitásának közel harmadára csökkent (csak 5,2x volt magasabb, mint az FO15Luc) és több mint felével lett alacsonyabb a HDM kultúrában mért luciferáz aktivitás is. Ezek az adatok azért is fontosak, mert a Dpe1 és Dpe2 elem közvetlen közelében egyéb, kevésbé konzervált, de irodalomból ismert cis-szabályozó aktivitással bíró DNS motívumok is azonosíthatók. Ilyen a Dpe1 elemtől 5' f íányban elhelyezkedő potenciális IKAROS kötőhely (mely a ΔDpe1/1-AC8Luc konstrukcióból a Dpe1 elemmel együtt hiányzik), illetve a Dpe1 elemtől 3' f íányban található ΔEF faktor felismerőhely (-1788 pozíció), vagy a Dpe2 elemben található másik ΔEF motívum (-1700 pozíció). Mivel ezek a felismerőhelyek igen közel fekszenek a konzervált DNS motívumokhoz, feltételezhetjük, hogy a hozzájuk kötődő fehérjék

kölcsönhatásba lépnek egymással és ezáltal transzkripció szabályozó hatásuk lehet. Erre utal az is, hogy  $\Delta$ IKAROS-AC8Luc konstrukció chondrocita specifikus aktivitása az AC8Luc-énak valamivel több mint a felére csökkent és 7,6x volt magasabb az FO15Luc-énál. Ezzel szemben ahol az IKAROS és a Dpe1 elem is hiányzik ( $\Delta$  Dpe1/1-AC8Luc) csak 5,2x magasabb riporter-gén aktivitást mértem. Végül a Dpe2 elem deléciója az 5' végi régió porcspecifikus luciferáz aktivitását 42%-kal csökkentette, ami meglepő annak fényében, hogy magának a Dpe2 elemnek inkább gátló hatását figyelhettük meg.

A távoli promoter elemek és a TATA motívum közeli DNS elemek (Pe1, Ine, SI) közötti kölcsönhatás vizsgálatára a Pe1, Ine és SI elem *in situ* mutagenézisére volt szükség. A bevitt pontmutációk a csoportban előzőleg elvégzett DNaseI és genomi footprinting, valamint metilációs interferencia analízis alapján lettek megtervezve és transzkripciós faktorok (Sox, NFI) kötőhelyének elrontását célozták meg. A Pe1 elemen korábban kétféle változtatást hajtottak végre: a Pe1M1 mutáció az elem egyik Sox- kötőhelyét tette tönkre, a Pe1M4 mutáció a kötőhelyek közötti összekötő szakaszt. Az Ine elembe egyenként háromféle mutációt vittek be, melyek közül az IneM2 az Ine elem Sox kötését teljesen tönkretette, míg az SI-en elvégzett mutációk egy NFI kötőhelyet változtattak meg. Mivel a távoli promoter elemekkel való kölcsönhatásra voltunk kíváncsiak a mutációkat az AC8Luc, illetve PS-FO15Luc konstrukciókban található rövid matrilin-1 promoterbe vittem be és a klónok szövetspecifikus aktivitását tranziens expressziókban vizsgáltam. Előállítottam az FO15Luc Pe1M1-IneM2 és a Pe1M1-SI2dm, valamint Pe1M4-SI2dm mutáns formáit és a nekik megfelelő AC8Luc változatokat is, ezeket szintén tranziens expressziókban teszteltem.

A Pe1M1 mutáció mindkét hosszú promoter konstrukcióban tizedére (majdnem az FO15Luc szintjére), míg a P1M4 mutáció hozzávetőleg kétharmadára csökkentette a porcspecifikus aktivitást és alig változtatta meg a HDM kultúrában és a fibroblasztokon mért riporter-gén aktivitásokat. Az SI elem mutációja minden általunk vizsgált sejt kultúrában jelentősen (ötödére a HDM és fibroblaszt, tizedére a chondrocita kultúrák esetében) csökkentette a riporter gén aktivitást, jelezve, hogy a korábban gátló hatásának hitt NFI transzkripciós faktor kötődése nélkülözhetetlen, pozitív szabályozó szerepet játszik a gén regulációjában. A két elem együttes mutációja az AC8Luc aktivitását minden sejt kultúrában az FO15Luc aktivitási szintje alá (Pe1M1-SI2dm), illetve annak közelébe (Pe1M4-SI2dm) vitte. Mindez arra utal, hogy a két faktor együttes jelenléte szükséges a jelentős szintű porcspecifikus génműködéshez és távoli DNS-elemek aktiváló hatásának közvetítéséhez, bár adataink arra utalnak, hogy az SI-elemnek inkább általános aktiváló hatása van. A  $\Delta$  Pe1M1-  $\Delta$  IneM2-AC8Luc mutáns porcspecifikus aktivitása szintén az FO15Luc porcspecifikus aktivitásához közel mozog egy szinten.

Korábban a csoport igazolta a LIE1 elem kölcsönhatását Sox9 és NFI fehérjékkel, de szerepe ellentmondásos volt, mert transzfekciós kísérletekben több kópiában sem növelte a homológ minimál promoter porcspecifikus aktivitását. Ezeknek az elemeknek a hatását ezért olyan vektorokon vizsgáltuk, melyekben az introni elemeket a nagy aktivitású Col2a1 gén 48bp-os enhancer elemével kombináltuk. Az alap a 8xE<sub>Col2a1</sub>-FO15Luc plazmid volt, amit a több kópiás Col2a1 enhancer elem matrilin-1 rövid promoter elé építésével kaptunk és 97x nagyobb porcspecifikus aktivitást mutatott, mint FO15Luc. A transzfekciós adatok alapján a 8xE<sub>Col2a1</sub>-8xLIE1-FO15Luc konstrukció viselkedése mindhárom típusú sejt kultúrában lényegében azonos volt a kiindulási, 8xE<sub>Col2a1</sub>-FO15Luc konstrukcióéval, vagyis ebben a környezetben a LIE1 elem hatása nem érvényesült. A 8xE<sub>Col2a1</sub>-8x102-FO15Luc konstrukció azonban HDM kultúrában 75%, CEC kultúrában 77% és CEF kultúrában 84%

aktivitáscsökkenést okozott, ami a transzkripciós szabályozásban betöltött negatív szerepére utal. A 102 bp-os és a LIE1 elemet 8 kópiában az irodalom szerint inaktív *Col2a1* rövid promoter által meghajtott luciferáz gén ( $8x E_{Col2a1}$ -PCLuc) elé is beépítettük. A  $8x E_{Col2a1}$ -PCLuc porcspecifikus aktivitása PCLuc-hoz képest 23x-ra nőtt. A 102 bp-os elemek jelenléte mindhárom kultúrában 50% körüli aktivitáscsökkenést okozott a  $8x E_{Col2a1}$ -PCLuc-hoz képest.

A LIE1 elemek jelenléte pedig CEC kultúrában 50%-os, HDM kultúrában 39%-os és CEF kultúrában 22%-os aktivitás csökkenéssel járt. Adataink alapján úgy tűnik, hogy a 102 bp-os elem általános transzkripciót gátló hatással bír, míg a LIE elem gátló hatása késői proliferatív porsejtekben a legmarkánsabb.

2. Elkezdtem az EMSA („electrophoretic mobility shift assay”) kísérleteket a rekombináns Sox9 fehérjével és kimutattam, hogy a Dpe1 elem három különböző mobilitású nukleoprotein komplex létrehozására képes, míg a Dpe2 elemen két különböző mobilitású komplex alakul ki. Rekombináns Sox5 és Sox6 fehérjékkel nem sikerült kötést kimutatni. Terveztem EMSA és supershift kísérletek elvégzését CEC sejtmagi kivonatokkal is. Megerősítettem egy korábbi EMSA eredményt, mely a HMGB1 fehérje Ine elemhez való kötődésére utal. Itt HMGB1 ellenanyaggal supershiftet sikerült kimutatni, bár a kísérlet körülményeit finomítani kell még. Párhuzamosan elkezdtem a kotranszfekciós elő kísérleteket egy HMGB1 expressziós klónnal és az FO15Luc, AC8Luc,  $\Delta$  Pe1M1- AC8Luc,  $\Delta$  IneM2-AC8Luc riporter-gén konstrukciókkal. Az eredmények alapján a HMGB1 expresszió a leginkább a HDM kultúrában növeli a luciferáz aktivitást. Legnagyobb hatást (2x) az AC8Luc esetén lehetett megfigyelni, a Pe1M1 mutáció csökkentette ezt a hatást, az IneM2 esetén a különbségek nem voltak egyértelműek, mert voltak olyan HMGB1 koncentrációk, ahol a luciferáz aktivitás akár 4x-e lett a HMGB1 nélküli aktivitáshoz képest.

3. Elkezdtük a mágneses gyöngyökhöz rögzített Pe1, Ine és LIE elemekhez chondrosarcoma és CEC sejtmagi kivonatból kötődő transzkripciós faktorok azonosítását MALDI tömegspektroszkópia segítségével. Itt a HMGB1 fehérje kötődését sikerült kimutatni az Ine elemhez, ami megerősíti EMSA adatainkat. Ennek alapján chondrosarcoma és CEC és CEF sejtmagi kivonatokból ChiP (kromatin immunprecipitáció) kísérletet terveztünk Dr. Bálint L. Bálint közreműködésével a Dpe1, Pe1 és Ine elemeken. Az első kísérletekben a HMG fehérje kötődését az Ine, a Pe1 és a Dpe1 elemhez CEF sejtmagi kivonatból sikerült egyértelműen kimutatni, illetve a Dpe1 elemnél chondrosarcoma magi kivonatokban is volt HMG kötődés. MALDI tömegspektroszkópia segítségével sikerült kimutatni az NFI (nuclear factor I) fehérje család tagjainak (NFI-A, illetve NFI-C) kötődését a LIE1 elemhez. Ez megerősíti a kutatócsoport korábbi EMSA, supershift és „pull down” kísérleti adatait, pontosítja ezeket és lehetőséget biztosít további *in vitro* kísérletek tervezésére.